

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



“ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2* EN UNA POBLACIÓN CON CÁNCER DE MAMA HEREDO-FAMILIAR DEL NORESTE DE MÉXICO; ESTUDIO CASOS Y CONTROLES”.

Por

DR. OMAR ALEJANDRO ZAYAS VIULLANUEVA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
SUBESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

ABRIL, 2018

“ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2* EN UNA POBLACIÓN CON CÁNCER DE MAMA HEREDO-FAMILIAR DEL NORESTE DE MÉXICO; ESTUDIO CASOS Y CONTROLES”.

Aprobación de la tesis:

Dra. Med. Laura Elia Martínez Villarreal
Directora de la Tesis

Dr. José Luis González Vela
Coordinador de Enseñanza

Dr. José Luis González vela
Coordinador de Investigación

Dr. David Hernández Barajas.
Jefe de Servicio o Departamento

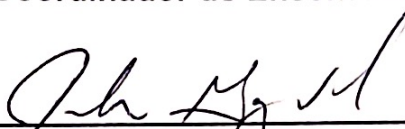
Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

"ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2* EN UNA POBLACIÓN CON CÁNCER DE MAMA HEREDO-FAMILIAR DEL NORESTE DE MÉXICO; ESTUDIO CASOS Y CONTROLES".

Aprobación de la tesis:


Dra. Med. Laura Elia Martínez de Villarreal
Directora de la Tesis


Dr. José Luis González Vela
Coordinador de Enseñanza


Dr. José Luis González Vela
Coordinador de Investigación


Dr. David Hernández Barajas.
Jefe de Servicio o Departamento


Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

Dedicatoria especial a mi esposa Mercedes Tijerina quien con su amor impulsó cada día de este camino académico. Así como a nuestra hija Sofía quien se convirtió en fuente de energía inagotable. Este trabajo no hubiese podido llevarse a cabo sin la visión y apoyo de la Dra. Laura Elia Martínez de Villarreal a quien agradezco profundamente por su esfuerzo y empeño en la excelencia académica, humana y de servicio asistencial.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESÚMEN	1
Capítulo II	
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 EPIDEMIOLOGÍA	2
2.2 FISIOPATOLOGÍA.....	2
Capítulo III	
3.1 SINTESIS DEL PROBLEMA.....	8
3.2 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	8
3.3 ORIGINALIDAD.....	9
3.4 APORTACIÓN.....	9
Capítulo IV	
4. MATERIAL Y METODOS	10
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	10
4.2 RECOLECCIÓN DE DATOS.....	10
4.3 CASOS.....	11
4.4 1ER. GRUPO CONTROL. CÁNCER DE MAMA.....	11
4.5 2DO. GRUPO CONTROL SANO.....	12
4.6 COLECCIÓN DE MUESTRAS.....	13
4.7 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	13
4.8 SECUENCIACION DE NUEVA GENERACIÓN.....	13
4.9 PREPARACIÓN DEL CHIP DE SECUENCIACIÓN.....	13
4.10 PREPARACIÓN DE ISP POSITIVAS Y ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIACIÓN AL CEBADOR	14
4.11 VALIDACIÓN DE SECUENCIACIÓN POR PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	14
Capítulo V	
5.1 HIPÓTESIS.....	15
5.2 HIPOTESIS NULA.....	15
Capítulo VI	
6. OBJETIVOS.....	16

6.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	16

Capítulo VII

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	17
7. 1 TAMAÑO DE LA MUESTRA	17
7.2 HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS.....	17

Capítulo VIII

8.1 LINEAMIENTOS ETICOS.....	18
------------------------------	----

Capítulo IX

9.1 CONFLICTO DE INTERÉS.....	18
-------------------------------	----

Capítulo X

10.RESULTADOS	19
---------------------	----

Capítulo XI

11 DISCUSIÓN.....	20
-------------------	----

Capitulo XII

12.1 CONCLUSIONES.....	23
------------------------	----

Capítulo XIII

13.1 ANEXOS.....	24
------------------	----

Capítulo XIV

BIBLIOGRAFÍA	34
--------------------	----

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Características basales de los grupos con cáncer Familiar y esporádico.....	25
2. Variantes Patogénicas.....	27
3. Grupo Cáncer Hereditario. Características demográficas, factores de riesgo y características tumorales.....	29
4. Variantes patogénicas en población Mexicana	30

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Susceptibilidad genética en cáncer de mama.....	3
2. ¿ Quién porta mutación en BRCA 1 Y BRCA 2?.....	5

Capítulo I.

Resumen.

Antecedentes: Las variantes patogénicas (PV) de los genes BRCA conllevan un riesgo de por vida de desarrollar cáncer de mama en el 50% -85% de los portadores. Su prevalencia en diferentes poblaciones ha sido reportada previamente. Sin embargo, hay poca información sobre los VP más comunes de estos genes en los latinoamericanos. Este estudio identificó las frecuencias BRCA1 y BRCA2 PV en una población femenina de alto riesgo del noreste de México y determinó la asociación de estas mutaciones con las características clínicas y patológicas de los pacientes.

Métodos: Las mujeres se dividieron en tres grupos: <40 años de edad al momento del diagnóstico y / o factores de riesgo de cáncer de mama hereditario (n = 101), edad > 50 años con cáncer de mama esporádico (n = 22) y mujeres sanas (n = 72). Su ADN se obtuvo a partir de muestras de sangre periférica y se analizaron mediante la secuenciación de próxima generación.

Resultados: se detectaron PV en 13,8% de pacientes del grupo 1 (BRCA1, 12 pacientes, BRCA2, 2 pacientes). Solo dos pacientes en el grupo 2 y ninguno en el grupo 3 exhibieron PV BRCA1. Las variantes de significado incierto se informaron en 15.8% de pacientes (n = 16). En el grupo 1, incluidos los pacientes con el subtipo triple negativo, la frecuencia de PV fue del 40% (12/30). La prevalencia del cáncer de mama en las mujeres jóvenes examinadas en este estudio fue más alta que la informada por la Vigilancia del Instituto Nacional del Cáncer, Epidemiología (15.5% vs. 5.5%, respectivamente).

Conclusiones: La frecuencia detectada de BRCA1 y BRCA2 PV fue similar a la informada en otras poblaciones. Nuestros resultados indican que los datos clínicos deben evaluarse antes de las pruebas genéticas y recomendar pruebas genéticas en pacientes con el subtipo triple negativo y otros aspectos clínicos.

Capítulo II.

Marco Teórico.

2.1 Epidemiología.

El cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en el mundo, después del cáncer de pulmón, según cifras publicadas por GLOBOCAN en el 2012. ⁽¹⁾ Sin embargo es por mucho la enfermedad maligna de mayor frecuencia en mujeres en el mundo. A nivel global, en el año 2010, se reportaron poco más de un millón y medio de casos. Cerca de la mitad de los casos y el 60% de las muertes ocurren en países en vías de desarrollo. Alrededor de 508,000 muertes por cáncer de mama fueron reportadas en el 2011. Representa el 23% de todos los casos de cáncer. Siendo la causa líder de muerte por cáncer en la mujer con un 14% del total. México no es la excepción, ya que representa el 11.34% de todos los cánceres en el país, ocupando el primer sitio en frecuencia en el sexo femenino. ⁽²⁾ Aunque las formas familiares llegan a comprender de un 20% a un 30% de todos los cánceres de mama, la mayoría de los genes responsables aún están por ser definidos. Las mutaciones en la línea germinal representan alrededor del 5 al 10% del total, mientras que el resto son explicados por alteraciones genéticas somáticas. **Fig 1.**

2.2 Fisiopatología.

Se ha mencionado que la enfermedad genética juega un rol central en el desarrollo del cáncer. La mejor forma de ser comprendida es estudiando las alteraciones del ADN, las cuales llevan al desarrollo del cáncer. Sin embargo, un entendimiento más profundo requiere comprender cómo los cambios genéticos alteran los programas celulares que llevan al crecimiento, invasión y metástasis.

La inducción química de los tumores generalmente requiere la aplicación secuencial de dos tipos de agentes, un “iniciador” y un “promotor”. El iniciador generalmente es un mutágeno que tiene efectos irreversibles y precede la acción

del promotor. Este modelo indica que el evento de la génesis tumoral inicia por una mutación y la progresión tumoral subsecuente puede ser generada por mecanismos genéticos o epigenéticos. ⁽³⁾

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea causada por un cúmulo de aberraciones genéticas, incluyendo mutaciones puntuales, amplificaciones cromosómicas, deleciones, rearrreglos, translocaciones y duplicaciones.

Todos los cánceres se desarrollan como resultado de la afectación de ciertos genes, como aquellos involucrados en la regulación del crecimiento celular y/o en la reparación del DNA. Sin embargo, no todas estas mutaciones son heredadas por los padres. Por ejemplo, las mutaciones pueden ocurrir solamente en células somáticas o tumorales y mutaciones de *novο* pueden ocurrir en células germinales (ej. Óvulo o espermatozoide) o en el huevo fertilizado durante la embriogénesis. Cabe mencionar que la caracterización biológica en base al análisis de expresión genética a gran escala aún se mantiene en estudio. ⁽⁴⁾

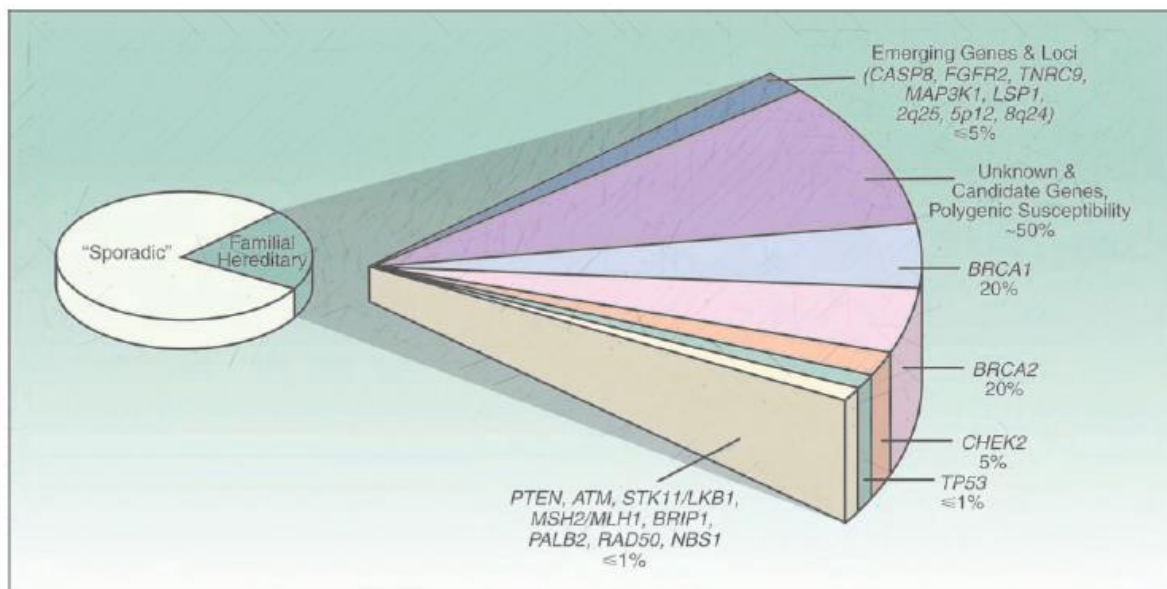


Fig 1. Susceptibilidad genética en cáncer de mama. *Clin Cancer Res* 2008;14(24): Fig 1.)

Los genes que generan susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de mama pueden ser clasificados en tres categorías de acuerdo con su frecuencia y nivel de riesgo que confieren: Baja frecuencia - Alto grado de penetrancia, Baja frecuencia – grado intermedio de penetrancia y Frecuentes con bajo grado de penetrancia. ⁽⁴⁾

Alrededor del 15% al 40% de los casos de cáncer de mama hereditario se deben a variantes patogénicas (PV) en los genes BRCA. (3,5) BRCA1 se encuentra en el cromosoma 17q21 y BRCA2 en 13q12-13. (6,7) BRCA PV puede estar presente en 1 de 8 pacientes con cáncer de mama de menos de 40 años y con dos familiares afectados. (3) El riesgo de desarrollar cáncer de mama a los 70 años es del 60% (intervalo de confianza [IC] del 95% = 44% - 75%) y 83% (IC 95% = 69% - 94%) para cáncer de mama contralateral. (8) Hay otras enfermedades malignas asociadas a las mutaciones en los genes BRCA, como el cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y melanoma, que deben tenerse en cuenta en los antecedentes familiares de los pacientes. La identificación de mutación de genes con alto grado de penetrancia ha brindado beneficio en el desarrollo de medidas preventivas en los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

La prevalencia en la mutación varía dependiendo de los grupos étnicos en estudio y pueden estar influenciadas por las llamadas “mutaciones fundadoras”, como han sido detectadas en judíos Askenazi e islandeses. Sin embargo, las prevalencias y grado de penetrancia reportadas han sido en su mayoría controversiales. ⁽³⁾

Desde la identificación de las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* ha ido en aumento el número de pruebas moleculares para la detección de variables genéticas con la finalidad de integrarlas a la clínica oncológica. Las distintas variantes génicas son específicas para diferentes grupos de población. La prevalencia de mutaciones en la línea germinal BRCA1 / 2 varía entre los grupos étnicos y las zonas geográficas. Se ha descrito una clara variabilidad entre los países latinoamericanos explicada por la mezcla de europeos, africanos y antepasados amerindios. (9) Una mutación fundadora, ex9-12del, ha sido descrita previamente en la población hispana. (10)

Aunque se describió en una población del sur de los Estados Unidos, también se documentó en el centro de México en un grupo no seleccionado para el estudio de historia de cáncer familiar, registrando una frecuencia del 29%. (11) México es un país genéticamente heterogéneo y la información sobre BRCA PV es escasa en general utilizando la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS).

En un estudio poblacional en California reportó una prevalencia en la mutación de *BRCA1* del 3.5% en una población hispanica. Así como del 1.3%, 0.5%, 8.3% y 2.2% en las poblaciones Afroamericanas, asiáticas, Judíos Askenazi y otra población no hispana. De este estudio se estimó que en la población general de hispanos la detección de la mutación sería de 0.27%. Ya que estas mutaciones son muy raras, la mejor forma de identificarlas es en pacientes jóvenes con antecedente familiar de cáncer de mama, ya que se ha reportado que dentro de los factores de riesgo más importantes para presentar esta variante genética es la historia familiar de cáncer de mama ⁽³⁾. En un estudio poblacional, (Australian Breast Cancer Family Study), entre mujeres con 2 o más familiares con cáncer de mama, se encontró la mutación en 1 de cada 2 pacientes. En aquellos con un solo familiar, la mutación se presentó en 1 de cada 16 pacientes. **Fig 2.**

Además del grupo étnico, la edad es otro factor que afecta la prevalencia de la mutación. En la población general excluyendo Askenazi es de 1 en 400 o 0.25%

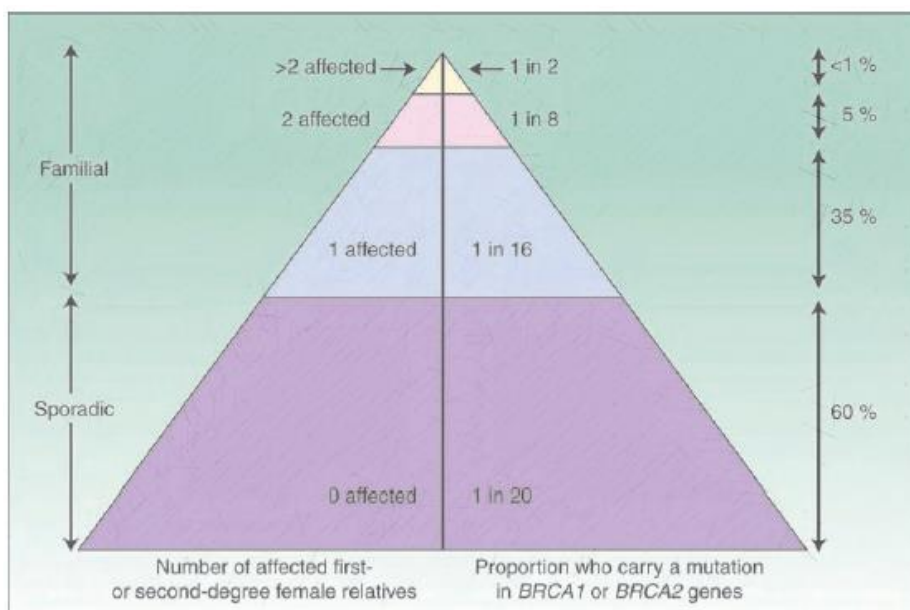


Fig. 2. ¿Quién porta mutación en *BRCA1* y *BRCA2*? *Clin Cancer Res* 2008;14(24): Fig 1.)

Sin embargo se ha llegado a reportar 1 en 10 mujeres menores de 40 años de edad, el equivalente al 10%.⁽¹²⁾

En un estudio que incluyó una población de origen hispano en Estados Unidos de América se analizó la prevalencia de mutaciones genéticas. Se incluyeron 109 pacientes clasificadas como de alto riesgo para portar la mutación. Mediante un modelo pronóstico se estimó que el riesgo de portar la mutación era de alrededor de 19.6%. La edad media de las pacientes fue de 37 años. Se realizó secuenciación completa de exones y se flanquearon los segmentos intrónicos. Se reportó un 30.9% con mutaciones deletéreas en *BRCA* en el 73% mutaciones en *BRCA1* y el restante 27% en *BRCA2*. En un 22.7% se detectaron una o más variantes no clasificadas. El 46.4% no se detectaron mutaciones en estos genes.⁽¹³⁾

Otro factor que influye en la prevalencia de mutaciones en estos genes es la característica biológica de la célula tumoral en relación con la presencia de receptores hormonales (estrógeno y progesterona) y la sobreexpresión de la proteína HER2Neu. La prevalencia estimada en mujeres menores de 40 años de edad con el estatus de receptores de estrógeno, progesterona y sobreexpresión de la proteína HER2Neu negativos, o triple negativo, se ha reportado en un 23.5% (IC 95% 15 – 30%), independientemente de la no selección de antecedente familiar. Mientras que para el subgrupo de mujeres menores de 50 años con característica del triple negativo, la prevalencia estimada fue de 17.5% (IC 95% 10 – 25%).⁽¹⁴⁾

En la última década se han incluido en las guías de prácticas clínicas del National Comprehensive Cancer Network la información de evaluación para personas con alto riesgo en cáncer de ovario y mama de origen familiar / hereditario. De igual manera en España se desarrollaron programas de consejos genético en cáncer hereditario. Todo esto a raíz de los avances en el descubrimiento de genes asociados al desarrollo de cáncer.

Recientemente la Dra. Villarreal-Garza ha publicado los resultados de una serie de 188 pacientes con cáncer de mama u ovario. La selección de los pacientes no fue restringida a antecedentes familiares de cáncer asociados. Se reportó una prevalencia de 21% en el grupo general en la mutación *BRCA*. En el subgrupo con diagnóstico de cáncer de ovario se documentó un 28%. Mientras que para el subgrupo con diagnóstico de cáncer de mama fue del 15%. La mutación reportada como fundadora (*BRCA1* ex9-12del) fue detectado en un 7%. (11)

En nuestra comunidad se carece de información científica en esta área. El propósito del presente trabajo es identificar las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en una población de alto riesgo con diagnóstico de cáncer de mama, en la población originaria del noreste de México para establecer su prevalencia, así como determinar el tipo de mutación más frecuente.

Capítulo III

3.1 *Síntesis del problema.*

El 10% de los cánceres de mama están asociados a alguna mutación genética. Los genes de mayor prevalencia son *BRCA1* y *BRCA2*, los cuales comprenden cerca del 50% de los casos. El portar la mutación se asocia con un riesgo del 75-85% de desarrollar cáncer en el transcurso de la vida. Se han reportado cerca de 1,000 mutaciones diferentes en estos genes y varía su prevalencia y relevancia clínica dependiendo de la zona geográfica y etnia.

El 10% del total de los cánceres de mama no es un número despreciable al ser la neoplasia de mayor prevalencia en la mujer. Es el equivalente a 167,000 casos nuevos de forma anual en el mundo. Este número supera a la totalidad de cánceres de colon reportados en el 2014 en Estados Unidos de América (136,830 casos totales).

Hasta el momento no se cuenta con evidencia científica sobre cuáles son los candidatos adecuados para realizar el estudio. El detectar una mutación de alta prevalencia permitiría disminuir los costos al realizar un estudio de tamizaje que permita investigar un panel reducido de mutaciones. Los paneles propuestos hasta el momento son el resultado de poblaciones con ascendencia hispana que reside en estados unidos de américa por lo que podría no representar las características genéticas de nuestra región.

3.2 *Justificación del estudio.*

Existe poca información sobre mutaciones específicas en nuestro país. Se carece de información en mutaciones en la línea germinal. El diseño de los estudios publicados son series de casos con resultados descriptivos. Estos resultados requieren ser replicados en otras zonas del país, así como agregar análisis estadístico a los datos descriptivos ya reportados.

3.3 *Originalidad.*

En este estudio se analiza una población del Noreste del país de México con criterios genéticos de alto riesgo para portar mutaciones germinales en los genes *BRCA1* y *BRCA2* mediante secuenciación masiva de nueva generación y su correlación con datos clínico-patológicos.

3.4 Aportación.

Información genética que facilite el establecimiento de métodos de tamizaje en población con alto riesgo de portar mutación en los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

Información sobre el comportamiento clínico de la enfermedad. Descrito en desenlaces de importancia como periodo libre de enfermedad, sobrevida libre de progresión y respuesta clínica al tratamiento.

Información sobre las características inmuno-histoquímicas en el estatus de expresión en los receptores de estrógeno, progesterona y sobreexpresión HER2neu.

Capítulo IV.

Material y Métodos.

4.1 *Diseño de estudio.*

Se realizará un estudio observacional con diseño de casos y controles. El estudio propuesto pretende, además de detallar la prevalencia en la mutación de *BRCA1* y *BRCA2*, describir presentación clínica, respuesta a tratamiento y periodo libre de enfermedad de manera retrospectiva.

Se optó por este diseño ya que los estudios de casos y controles son de máxima utilidad para el estudio de enfermedades de baja frecuencia poblacional y entregan como medida epidemiológica específica un estimador de riesgo expresado como razón de momios u “odds ratio”.

4.2 *Recolección de datos.* Retrolectiva. Se rastrearon pacientes mediante expediente electrónico, previamente diagnosticados en el Centro Universitario Contra el Cáncer. Se seleccionaron casos con características descritas en criterios de inclusión, así como rastreo de casos con sospecha de asociación genética familiar. Posteriormente fueron entrevistados de manera telefónica para confirmación de datos en el historial médico. Tras acceder al participar en el estudio fueron entrevistados en el Centro Universitario Contra el Cáncer para firma de consentimiento y toma de muestra de sangre periférica.

Los controles enfermos fueron seleccionados del mismo universo poblacional que los casos y llevaron el mismo proceso previamente comentado. Los controles sanos fueron seleccionados de la población general, mediante pláticas informativas sobre cáncer de mama.

4.3 Casos.

Criterios de Inclusión.

- Hombres y mujeres.

- Mayores de 18 años de edad.
- Diagnóstico histopatológico con cáncer de mama.
 - Adultos \leq 40 años de edad al diagnóstico o
 - Cáncer de mama bilateral antes de los 40 años (al menos uno de los tumores) o
 - Un cáncer de mama y un cáncer de ovario en la misma paciente o
 - Cáncer de mama con antecedente de 3 o más familiares con cáncer de mama o
 - Cáncer de páncreas con antecedente de cáncer mama y ovario en la familia.
- Antecedente de cáncer de mama en familiar masculino de primer grado.
- Originarios del Noreste de México; Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. Incluyendo ascendencia de primero y segundo grado.
- Firma del formato de consentimiento informado.

Criterios de Exclusión.

- Sospecha de cáncer primario de otro sitio sin incluir cáncer de páncreas u ovario
- Mujeres embarazadas

Criterios de Eliminación.

- Muestras sanguíneas insuficientes o de mala calidad*.
- ADN insuficiente o de mala calidad*.
- Datos incompletos.

* Las muestras insuficientes o de mala calidad serán tomadas nuevamente del mismo paciente con la intención de no eliminar el caso.

4.4 1er Grupo Control. Cáncer de mama.

Criterios de Inclusión.

- Mujeres.
- Edad mayor de 50 años.
- Diagnóstico por patología de cáncer de mama.
- Estatus de receptores hormonales de estrógeno y progesterona positivos.

- Originarios del Noreste de México; Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. Incluyendo ascendencia de primero y segundo grado.
- Firma del formato de consentimiento informado.

Criterios de Exclusión.

- Mutación conocida en la familia que implique susceptibilidad para cáncer de mama.
- Familiares de 1er y 2o grado con antecedente de cáncer de mama u ovario.
- Antecedente de cáncer de ovario o 2 cánceres primarios.
- Cáncer de mama bilateral.

Criterios de Eliminación.

- Muestras sanguíneas insuficientes o de mala calidad.*
- ADN insuficiente o de mala calidad*.
- Datos incompletos.

* Las muestras insuficientes o de mala calidad serán tomadas nuevamente del mismo paciente con la intención de no eliminar el caso.

4.5 2o Grupo Control sano.

- Hombres y Mujeres.
- Edad ≥ 18 años.
- Sin antecedente de cáncer familiar o personal y
- Originarios del Noreste de México; Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. Incluyendo ascendencia de primero y segundo grado.
- Firma del formato de consentimiento informado.

Criterios de Exclusión.

- Mutación conocida en la familia que implique susceptibilidad para cáncer de mama.
- Antecedente de biopsia en mama por cualquier razón.
- Antecedente de Radioterapia.

Criterios de Eliminación.

- Muestras sanguíneas insuficientes o de mala calidad*.
- ADN insuficiente o de mala calidad*.

- Datos incompletos.

* Las muestras insuficientes o de mala calidad serán tomadas nuevamente del mismo paciente con la intención de no eliminar el caso.

4.6 *Colección de muestras*

Se colectarán 5 ml de sangre venosa periférica, mediante venopunción, en tubo con EDTA. El paciente no requerirá de un ayuno especial para la recolección de la muestra, la cual deberá ser identificada y ser transportada para su almacenamiento y proceso.

4.7 *Extracción y cuantificación de ADN.*

Se aislará ADN genómico (ADNg) a partir de las muestras sanguíneas colectadas. Las muestras se procesarán en el equipo QIAcube (Qiagen) haciendo uso del estuche comercial QIAamp® ADN Investigator, siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN extraído cumplirá un intervalo de calidad dada por la relación de absorbancia 260/230 y 260/280 (Rango: ≥ 1.8 y < 2.0), midiéndose estos parámetros con un espectrofotómetro de la marca NanoDrop.

4.8 *Secuenciación de nueva generación (NGS) de bibliotecas genómicas.*

Se utilizará la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*), usando plataforma de Ion Torrent® de Applied Biosistem®.

4.9 *Preparación del chip de secuenciación*

Se utilizara el estuche comercial Ion PGM™ Template OT2 200 V2, que contiene reactivos de preparación de la plantilla. Con la ayuda del equipo Ion OneTouch™, que permitirá la generación de microreactores para la amplificación clonal masiva en paralelo. El mismo sistema permitirá recuperar las partículas utilizando una minicentrifugación que tiene integrado el sistema y finalmente las esferas serán recuperadas.

4.10 Preparación de ISP positivas y alineamiento de la secuenciación al cebador

Se usará el kit Ion Sphere™ Quality Control, del cual se tomará el tubo del control que pertenece al estuche y se centrifugará por 2 s antes de tomar alícuotas y enseguida se añadirá 5 µl del control directamente al enriquecido, en un tubo de PCR 0.2 µl (no de poliestireno). Se resuspenderá el contenido del tubo y se centrifugará por 2 min a 15.500 g. El sobrenadante se eliminará dejando 15 µL de líquido en un tubo separado. Se agregarán 12 µL de Sequencing Primer para un volumen total es de 27 µl; hecho lo anterior se resuspenderá la mezcla. El programa por usar en el termociclador es de 95 °C por 2 min y 37 °C por 2 min, usando la opción tapa calentada. La reacción se dejará a temperatura ambiente y luego se procederá a colocarla en el chip de secuenciación, y se utilizará el chip Ion 316™.

4.11 Validación de secuenciación por PCR cuantitativa (qPCR)

La validación de los resultados se realizará por qPCR utilizando la tecnología del OpenArray. El diseño del arreglo estará sujeto a los resultados obtenidos de la secuenciación. Debido a que los oligonucleótidos y sondas se encuentran adheridos a la placa, el mix de reacción contendrá solamente 2.5µl de TaqMan® OpenArray® Master Mix y 2.5µl de ADNg a una concentración de 50 ng/µl. Se utilizará el termociclador GeneAmp® PCR System 9700. Finalizado el programa del termociclador, se colocarán los TaqMan OpenArray en el lector de placas OpenArray® NT Imager y se transferirán los datos de cada muestra en un archivo que contiene las coordenadas de cada SNP determinado. Con el uso SPSS se realizará la caracterización genotípica de las muestras de ADN y se transferirán los datos en un archivo de texto para su análisis posterior.

Capítulo V

5.1 Hipótesis.

La prevalencia en las mutaciones en la línea germinal de *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes de alto riesgo en la población del Noreste de México no difiere a lo reportado en la literatura.

5.2 Hipótesis Nula.

La prevalencia en las mutaciones en la línea germinal de *BRCA1* y *BRCA2* es mayor en pacientes de alto riesgo en la población del Noreste de México a lo reportado en la literatura.

Capítulo VI

Objetivos.

6.1 *Objetivo General.*

Analizar la presencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* en mujeres con cáncer de mama heredo-familiar en una población del Noreste de México para establecer su prevalencia y describir las mutaciones más frecuentes.

6.2 *Objetivo Específicos.*

- 1.- Caracterización inmuno-histoquímica sobre el estatus de receptores de estrógeno, progesterona y HER2neu.
- 2.- Descripción de desenlaces clínicos; Respuesta clínica al tratamiento sistémico y/o citotóxico, periodo libre de enfermedad, sobrevida libre progresión.
- 3.- Asociación genotipo – fenotipo y genotipo – ambiental. Variables ambientales incluidas; Obesidad, anticonceptivos orales, tabaquismo.

Capítulo VII

Análisis Estadísticos.

7.1 *Tamaño de muestra.*

Se utilizó el programa de software para cálculo de muestra de epitools para una muestra de casos y controles con una proporción esperada en el grupo de casos del 85% y Odd ratio de 10. Con error alfa de 0.05 y beta de 0.8. Resultando en 25 por grupo.

7.2 *Herramientas Estadísticas.*

Las variables clínicas cuantitativas se presentaron en *medias* (m) con *desviaciones estándar* (DS) y *proporciones* cuando fue el caso. Se hizo una comparación entre grupos (hereditaria familiar vs esporádica y portadora versus no portadoras) mediante la *prueba t* para la comparación de dos medias independientes y la *prueba de Chi cuadrado* para la comparación de dos proporciones expresadas por porcentaje. Hicimos una razón de momios (OR) para la edad, el cáncer bilateral, la historia familiar y las variables triples negativas. La versión 20 de SPSS (IBM, Armonk, NY) para Windows 7 se usó para el análisis estadístico.

Capítulo VIII

8.1 *Lineamientos éticos.*

El estudio se llevó a cabo tras la aprobación del comité de ética hospitalario. Todo el trámite y realización del estudio está apegado a las buenas prácticas clínicas y buen manejo de expediente médico. Número de registro: (GEN15-002)

Capítulo IX

9.1 *Conflicto de Interés.*

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses para la realización de este estudio.

Capítulo X

Resultados.

Todos los sujetos nacieron en el noreste de México. Desde enero de 2005 hasta agosto de 2015, 3,065 pacientes fueron registrados en la base de datos del Centro Universitario Contra el Cáncer. Eliminamos a 265 pacientes porque la edad registrada no era confiable. Hubo 436 pacientes (15,5%) con edades <40 años en el momento del diagnóstico, de los cuales 335 no se localizaron o no aceptaron participar. Finalmente, se incluyeron 101 pacientes con cáncer de mama familiar / hereditario, 22 pacientes con cáncer esporádico (controles positivos) y 72 mujeres sanas (controles negativos). Las características clínicas de los pacientes y los grupos de control positivo se muestran en la **Tabla 1**. Como era de esperarse basado en los criterios de inclusión, la edad media del grupo de cáncer de mama familiar fue significativamente menor ($36,9 \pm 5,2$ años). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las variables sociodemográficas. Con respecto a la histopatología tumoral, el 53% de los pacientes en el grupo de cáncer hereditario exhibió grado nuclear 3 en comparación con solo el 10% en el grupo de cáncer esporádico ($p < 0,001$).

El análisis mutacional de *BRCA1* y *BRCA2* reveló 16 portadores de mutaciones. 14 portadores (13,8%) presentan 10 PV diferentes en el grupo 1 (Ver **Tabla 2**). En general, se detectaron 12 PV diferentes, y la mayoría de ellos (82%) fueron de *BRCA1* (13/16), mientras que solo el 18% (3/17) fueron de *BRCA2*. Entre estos, 10 variantes fueron clasificadas como patógenas y siete como probablemente patógenas. Usando NGS, identificamos el 62% de las variantes genéticas (13/21), y el 38% restante (8/17) se identificaron mediante MLPA. De este último grupo, dos variantes correspondieron a deleciones que representaron el 28,5% de las variantes genéticas: ex9-12del y ex16-17del. Se detectaron dos PV (1 en *BRCA1* y uno en *BRCA2*) en el grupo de control positivo. No se detectaron PV en las 72 mujeres sanas.

Una comparación de características demográficas y clínicas entre los grupos de

mutación y no mutación solo reveló una diferencia en la frecuencia de la lactancia (35.2% de los pacientes mutados realizaron la lactancia materna en comparación con 59.3% de los pacientes no mutados, $p = 0.04$). En cuanto a las características tumorales, el subtipo triple negativo se observó con mayor frecuencia en pacientes con BRCA PV que en aquellos sin PV (65% frente a 22,6%, $p < 0,001$). La asociación del subtipo triple negativo con PV de BRCA mostró un OR de 6,4 (IC del 95%, 2,22-18,70). Otras características clínicas y tumorales no difirieron estadísticamente entre los grupos de mutación y no mutación (Tabla 3).

Capítulo XI

11.1 Discusión.

El centro de oncología de la universidad presta atención a la región noreste de México. Al menos el 30% proviene de otros estados y en su mayoría son personas de bajos ingresos que viven en zonas rurales. Por lo tanto, la invitación a participar por teléfono y el costo de viajar provocaron este estudio una baja tasa de participación en comparación con la población encontrada en la base de datos local, pero el tamaño de la muestra se completó como se estimó previamente.

Debido a la falta de caracterización genética de los genes BRCA en México, se incluyeron 72 mujeres sanas como control negativo. La mayoría de los estudios previos se realizan sobre hispanos de diversos orígenes. Debido a la poca información en México en población sana este estudio intentó captar nueva información en este subgrupo. Sin embargo, variantes patogénicas locales no se detectaron entre los controles sanos. Poca información en México existe sobre las variantes de BRCA en esta población.

La frecuencia de PV en los genes BRCA1 / 2 informados por las clínicas que atienden a las poblaciones de alto riesgo genético en América del Norte es de aproximadamente 9,3% [15]; Por el contrario, la frecuencia de PV reportados en la población hispana del sudoeste de los Estados Unidos es tan alta como 25% [16]. En el presente estudio de casos y controles, se observó una frecuencia del 20,7%

de PV en una población del noreste de México, que es similar a la informada previamente [17]. En México, se ha informado que la frecuencia de PV de estos genes es del 4% al 27%, dependiendo de la población estudiada (por ejemplo, casos con factores de riesgo y casos esporádicos) y las características del tumor [17-20]. Particularmente, entre las poblaciones con características familiares / hereditarias, la frecuencia fue de 10.2% en México, que no es estadísticamente diferente de nuestro estudio ($p = 0.14$) [17].

Se han descrito más de 1.500 VP clínicamente significativas para cada gen BRCA [21, 22]. Entre la población mexicana, 53 variantes genómicas patogénicas de BRCA1 / 2 (24 en pacientes con inicio temprano o antecedentes familiares de cáncer de mama, 28 en poblaciones no seleccionadas, y una en poblaciones no seleccionadas y en aquellas con inicio temprano o antecedentes familiares de cáncer de mama). Es importante destacar que, a excepción de una reordenación genómica grande (c.548? _4185? Del), que se considera una mutación fundadora en los mexicanos, no hubo otras mutaciones recurrentes en estos pacientes (Tabla 4).

Algunos laboratorios han introducido ensayos multiplex, que analizan las variantes genéticas más comunes. En el presente estudio, además de la variante genómica fundadora, todos los pacientes analizados hasta la fecha eran portadores de diferentes variantes patogénicas. A partir de estos datos, podemos inferir que el uso de estos paneles puede proporcionar información faltante, al menos para las poblaciones mexicanas.

Las nuevas tecnologías, como el NGS, se utilizan actualmente para las pruebas genéticas porque ahorran tiempo, son rentables y tienen una mayor sensibilidad y especificidad [23]. Sin embargo, es importante utilizar al menos dos tecnologías genómicas diferentes, en casos negativos mediante un solo método, para descartar variantes genómicas, porque como se observó en este estudio, el uso de MLPA permitió la identificación del 38% de los PV.

Debido a que estas tecnologías no están disponibles en todos los entornos clínicos, se deben considerar los criterios clínicos para seleccionar pacientes para pruebas genéticas. Recientemente, los criterios para el cáncer de mama hereditario han cambiado, con una expansión en el rango de edad relacionado con el riesgo, los antecedentes familiares y las características patológicas [24]. Los pacientes con el fenotipo triple negativo incluso pueden ser mayores (> 50 años) [22]. En un estudio previo en Australia y Polonia que incluía pacientes no seleccionados por edad o antecedentes familiares de cáncer, la prevalencia estaba entre el 9,3% y el 9,9% [25]. En un estudio similar de una población mexicana con una mediana de edad de 43 años (rango, 23-50 años) y el fenotipo triple negativo, la prevalencia de PV de BRCA fue del 23% [26]. En este estudio, la frecuencia fue tan alta como el 43,3%, que representa el 65% (OR, 6,4, IC 95%, 2,2-18,7) de los pacientes con PV, como se mencionó anteriormente. Este hallazgo indica la importancia de los aspectos clínicos en la toma de decisiones con respecto a la necesidad de pruebas genéticas.

Los datos personales y ambientales son características importantes para el asesoramiento y para disminuir el riesgo de cáncer de mama y otras enfermedades malignas hasta cierto punto. La lactancia materna se considera un factor de protección importante para el desarrollo del cáncer. En el presente estudio, una menor proporción de mujeres con PV realizaron lactancia materna. En consecuencia, es importante recomendar la lactancia a los portadores de PV BRCA. Se ha descrito que este último factor de riesgo modificable es significativo para disminuir el riesgo de cáncer de mama, con un riesgo relativo de 0,63 (IC 95%, 0,46-0,86) en poblaciones de BRCA1 mutadas [27]. Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer estudio que compara el efecto de la lactancia materna en el cáncer de mama de los jóvenes entre los portadores de los PV de BRCA y los no portadores en México. El estado del gen BRCA es importante para la selección del tratamiento. El uso de análogos de platino ha demostrado más beneficios en casos de metástasis, con una respuesta favorable del 54% en

comparación con el 19% para el uso de otras terapias [28]. Nuevas terapias que involucran inhibidores de poli (ADP-ribosa) polimerasa han mostrado ventajas cuando se usan en combinación con quimioterapia para casos BRCA-positivos [29].

En este estudio, la terapia no se decidió sobre la base del estado del gen BRCA. En el presente estudio, las PV's de BRCA se detectaron con una frecuencia del 20% en una población de alto riesgo, utilizando secuenciación completa de genes junto con MLPA.

Capítulo XII

12.1 Conclusiones.

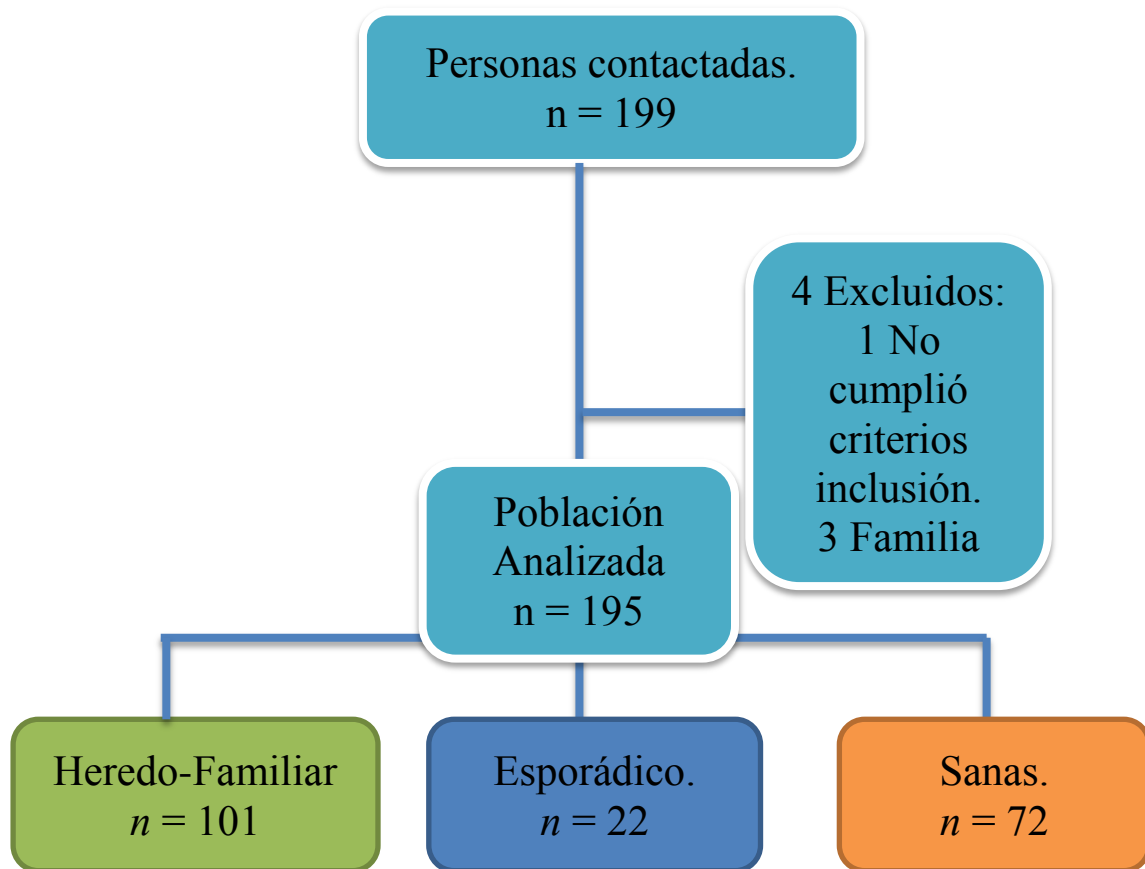
Los datos y discusión presentada resaltan la necesidad de realizar pruebas genéticas no solo para el asesoramiento genético sino también para el tratamiento.

Debido a que existe una alta variabilidad en el tipo y la frecuencia de las variantes del gen BRCA en la población mexicana, proponemos el uso de tecnologías basadas en NGS y MLPA para documentar de la mejor manera la presencia de variantes patogénicas en los genes BRCA1 y BRCA2.

También afirmamos que los aspectos clínicos pueden facilitar la toma de decisiones con respecto a la necesidad del análisis BRCA. El subtipo triple negativo tiene una buena correlación con las mutaciones de BRCA, por lo que es difícil excluir esta población del análisis. Las estrategias para promover un ambiente más saludable se deben incluir en el consejo médico a los pacientes. La lactancia materna como un factor de riesgo modificable debe ser parte de los análisis en futuros estudios para determinar el impacto en grupos de alto riesgo no solo de cáncer de mama sino también de cáncer de ovario.

Capítulo XIII

13.1 Anexos.



Esquema I. 1 paciente fue excluida tras revisión de expediente médico, no cumpliendo criterios de inclusión en el grupo de controles. 3 personas fueron excluidas ya que eran de la misma familia nuclear, se concluyó que no contribuirían con mayor información para análisis genético.

TABLE 1. Características Basales de los grupos con cáncer Familiar y Esporádico; Factores de riesgo, características del tumor y tratamiento.			
Variable	Cáncer Hereditario n = 101 (%)	Cáncer Esporádico n = 22 (%)	
Edad al diagnóstico (DS)	36.9 (5.2)	53.1 (4.8)	$p = 0.0001$
Cáncer Tipo Familiar	54 (53)	0 0	$p = 0.0001$
IMC, media (SD)	27.7 (5.3)	27.1 (4.2)	$p = 0.61$
Edad a la menarca (DS)	12.3 (1.4)	12.7 (1.3)	$p = 0.22$
Paridad, media (DS)	2.4 (1.6)	3.6 (2.1)	$p = 0.003$
Nuliparidad	18/100 (18)	1 (5)	$p = 0.12$
Edad al 1er embarazo (DS)	21 (5.4)	23 (5.6)	$p = 0.31$
Lactancia	48/76 (63)	11/20 (55)	$p = 0.51$
Uso de Anticonceptivos	38/97 (39)	8/20 (40)	$p = 0.91$
Tabaquismo	17 (17)	7 (32)	$p = 0.10$
Histología			
Ductal	80/90 (89)	18/22 (82)	$p = 0.37$
Otro	10/90 (11)	4/22 (18)	$p = 0.39$

Grado nuclear				
2		31/80 (39)	18/21 (86)	$p = 0.0001$
3		42/80 (53)	2/21 (10)	$p = 0.0004$
Etapas				
0		1/101 1%	1. (0)	$p = 0.63$
I-II		57/101 56%	17/22 (77)	$p = 0.08$
III		39/101 39%	5/22 (23)	$p = 0.16$
IV		4/101 4%	0 (0)	$p = 0.34$
T				
0-1		29/100 29%	11/22 (50)	$p = 0.058$
2		37/100 37%	7/22 (32)	$p = 0.65$
3		25/100 25%	3/22 (14)	$p = 0.26$
4		9/100 9%	1/22 (4)	$p = 0.43$
N				
Positivo		59/99 (60)	12/22 (55)	$p = 0.66$
IHC				
ER (+)		52/95 55%	22/22 100%	$p = 0.0001$
PR (+)		47/95 49%	19/93 21/22 95%	$p = 0.0001$
HER (+)		20%	5/22 23%	$p = 0.75$
Triple negativo		30/93 32%	0 0%	$p = 0.002$
Tipo de Cirugía				
Mastectomía	Radical	80/99 81%	10/22 45%	$p = 0.0005$
modificada.				
Cirugía conservadora		18/99 18%	12/22 55%	$p = 0.0003$

Tipo de Quimioterapia			
Neoadyuvante	28/100 28%	4/22 18%	$p = 0.33$
Adyuvante	62/100 62%	15/22 68%	$p = 0.59$
Basada en Antraciclinas	9/62 15%	7/15 40%	$p = 0.03$
Antraciclina-Taxano.	45/62 72%	6/15 47%	$p = 0.06$

DS, Desviación estándar; IHC, Inmunohistoquímica; ER, receptor estrogénico; PR, receptor progesterona.

Tabla 2. Variantes Patogénicas

<i>BRCA1</i>	Exon	Intron	Posición genómica	# de Pacientes
c.1137T > G; p.Ile379Met	10		4111246411	1
c.1576C > T; p.Gln526Ter	10		41245972	1
c.2351C > T; p.Ser784Leu	10		41245197	1
c.4327C > T; p.Arg1443Ter	12		41234451	1
c.4358-10C > T		12	41228641	1
c.4484+39A > G		13	41228466	1
c.4682C > T; p.Thr1561Ile	15		41223249	1

*c.5123C > A; p.Ala1708Glu	17	41215920	1
c.5346G > A; p.Trp1782Ter	21	41201198	1
c.557C > A; p.Ser186Tyr	8	41249297	1
c.682_683insAGCCATGTGG; p.Gly228Glu*15	9	41246724	1
**c.5278-?_5406 +?dup	21-22		1
**c.4676-?_5074 +?del	16-17		3
** c.548?_4185 ?del	9-12		3
**c.-716-?_80 +?del	P-2		1
c.6923A > C; p.Lys2308Thr	12	32918776	1
<i>BRCA2</i>			
c.8488-1G > A	19	32945092	1
c.9117G > A	23	32954050	1
*c.8377G > A; p.Gly2793Arg	19	32944584	1
*Variantes patogénicas en grupo control. **Detectadas por método MLPA.			

Tabla 3. Grupo Cáncer Hereditario. Características demográficas, factores de riesgo y características tumorales.

Variable	BRCA portadores, n = 21	No-portadores, n = 80	
Edad: m (DS)	35.6 (4.5)	37.3 (5.4)	$p = 0.18$
Historia Familiar de Cáncer	66.6%	50.0%	$p = 0.17$
IMC, m (DS)	27.8 (5.0)	27.7 (5.5)	$p = 0.94$
Edad a la menarca m (DS)	12.1 (2.9)	12.1 (1.7)	$p = 1.00$
No. Embarazos m (DS)	2.4 (2.1)	2.3 (1.5)	$p = 0.80$
Nuliparidad (%)	19.0%	17.7%	$p = 0.89$
Edad al 1er embarazo, m (DS)	20.7 (4.9)	21.6 (5.6)	$p = 0.50$
Lactancia %	35.2%	59.3%	$p = 0.04$
Uso Anticonceptivos (%)	40%	37.9%	$p = 0.86$
Tabaquismo (%)	14.2%	17.5%	$p = 0.72$
Histología, ductal. (%)	88%	89%	$p = 0.90$
Grado Nuclear. (%)			
2	27%	41.5%	$p = 0.28$
3	67%	49.2%	$p = 0.22$
Etapas. (%)			
0	4.7%	0%	$p = 0.0002$
I-II	71.4%	52.5%	$p = 0.12$
III	23.8%	42.5%	$p = 0.11$
IV	0%	5%	$p = 0.29$

T			
0–1	19%	31.6%	$p = 0.26$
2	57%	31.6%	$p = 0.03$
3	19%	26.6%	$p = 0.47$
4	4.7%	10.2%	$p = 0.43$
N			
Positivo	50%	62%	$p = 0.33$
IHC			
ER (+)	30%	60.5%	$p = 0.01$
PR (+)	30%	53.9%	$p = 0.058$
HER (+)	16%	21.6%	$p = 0.57$
Triple Negativo.	65%	22.6%	$p = <0.001$

m, media; DS, desviación estándar; IHC, Inmunohistoquímica; ER, receptor estrogénico; PR, receptor progesterona

Tabla 4. Variantes patogénicas en población Mexicana.			
Estudio	EXON	BRCA1	BRCA2
Calderón-Garcidueñas 2005	11	3587delT	2664InsA
Vaca – Paniagua 2012	NE	c.2805_2808delAGAT	c.2639_2640delTG
		c.3124_3133delAGCAATATTA	c.5114_5117delTAAA

Villarreal-Garza 2017	2	185delAG	
	5	330A G (R71G)	
		3717C T(Q1200X)	
	11	2415delAG	
		2925del4	
		3878delTA	
		943ins10	
		del exon9-12	
		2452C T(Q742X)	
	13	4446C T(R1443X)	
	18	5242C A (A1708E)	
	9-12	c.548?_4185?del	
			2971del5
			4321insAA
			4534delAT
		c.1016-1017insA	5859delC

Torres-Mejía 2015	11	c.2071-2071delA	6686delC
		c.2296-2297delAG	c.2808-2811delACAA
		c.2433delC	c.3264-3265insT
		c.3598C > T	c.4111C > T
			c.5542delA
			c.6486-6489delACAA
	10		c.1796-1800delTTTAT
Zayas-Villanueva	13	c.4327C > T	
	18	c.5123C > A	
	8	*c.557C > A; p.Ser186Tyr	
	9	c.682_683insAGCCATGTGG; p.Gly228Glufs*15	
	10	*c.1137T > G; p.Ile379Met	
		c.1576C > T; p.Gln526Ter	
		*c.2351C > T; p.Ser784Leu	
	12	c.4327C > T; p.Arg1443Ter	*c.6923A>C; p.Lys2308Thr
	I -12	*c.4358-10C > T	
	I - 13	*c.4484 + 39A > G	
	15	*c.4682C > T; p.Thr1561Ile	
	17	*c.5123C > A; p.Ala1708Glu	

	21	c.5346G > A; p.Trp1782Ter	
	19		c.8488-1G > A
			c.8377G > A; p.Gly2793Arg
	9-12	c.548-?_4185 +?del	
	16-17	c.4676-?_5074 +?del	
	21-22	c.5278-?_5406 +?dup	
	23		c.9117G > A
	P-2	c.-716-?_80 +?del	
I. Intron. Dos variantes patogénicas fueron detectadas en la región intrónica. 1 rearreglo grande fue la única variante patogénica que recurrió entre dos estudios. *Probablemente Patogénica.			

Familias con un único caso de cáncer de mama

- Cáncer de mama diagnosticado antes de los 30 años, o
- Cáncer de mama primario bilateral antes de los 40 años (al menos uno de los tumores) o
- Un cáncer de mama y un cáncer de ovario en la misma paciente

Familias con dos casos en familiares de primer grado *

- Dos casos de cáncer de mama o cáncer de mama bilateral, al menos uno diagnosticado antes de los 50 años, o
- Dos o más casos de cáncer de ovario (independientemente de la edad), o
- Un cáncer de mama y un cáncer de ovario en dos familiares (independientemente de la edad), o
- Un casos de cáncer de mama en varón y otro de mama/ovario mujer (independientemente de la edad)

Familias con tres o más casos afectados por cáncer de mama, al menos dos en familiares de primer grado

No considerar a los varones al contabilizar el grado de parentesco.

*Familiares de primer grado son madres, hijas o hermanas

Capítulo XIV

Bibliografía.

- 1.- J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, et.al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods, and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J Cancer*. 2015 Mar 1; 136(5): E359-86.
- 2.- Claudia Arce, Enrique Bargalló, Yolanda Villaseñor, Carlos Gamboa, Fernando Lara, Víctor Pérez Sánchez y Patricia Villarreal. “*Cáncer de mama*”. *Cancerología* 6 (2011): 77 – 86.
- 3.- Olufunmilayo I. Olopade. Advances in Breast Cancer: Pathways to Personalized Medicine. *Clin Cancer Res* 2008;14. December 15, 2008.
- 4.- Devita, Hellman y Rosenberg. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 9th Edition.
- 5.- Fergus J. Couch, Katherine L. Nathanson, and Kenneth Offit. Two Decades After *BRCA*: Setting Paradigms in Personalized Cancer Care and Prevention. *Science*. 2014 March 28; 343(6178): 1466–1470. doi:10.1126/science.1251827.
- 6.- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et.al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990 Dec 21; 250(4988): 1684-9.
- 7.- Wooster R, Neuhausen, SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994 Sep 30: 265(5181); 2088-90.
- 8.- Nasim Mavaddat, Susan Peock, Debra Frost, Steve Ellis, Radka Platte, et.al. On behalf of EMBRACE. Cancer risks for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation carriers: results From Prospective Analysis of eMBrAce. *J Natl Cancer Inst*;2013;105:812–822.
- 9.- Carlos Andrés Ossa, Diana Torres. Founder and recurrent mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes in Latin American countries: State of the Art and literature review. *The Oncologist*. 2016;21;1-8.
- 10.- Jeffrey N. Weitzel, Jessica Clague, Arelis Martir-Negron, Raquel Ogaz, Josef Herzog, Charite Ricker, Chelsy Jungbluth, Cheryl Cina, Paul Duncan, Gary

Unzeitig, J. Salvador Saldivar, Mary Beattie, Nancy Feldman, Sharon Sand, Danielle Port, Deborah I. Barragan, Esther M. John, Susan L. Neuhausen and Garrett P. Larson. Prevalence and type of *BRCA* Mutations in Hispanics undergoing genetic cancer risk assessment in the southwestern united states: A report from from the clinical cancer genetics community research network. J Clin Oncol. Volume 31. Number 2 January 10, 2013.

11.- Cynthia Villarreal-Garza, Rosa María Alvarez-Gomez, Carlos Perez Plascencia, Luis A. Herrera, Josef Herzog, Danielle Castillo, Alejandro Mohar, Clementina Castro, Lenny N. Gallardo, Dolores Gallardo, Miguel Santibañez, Kathleen R. Blazer and Jeffrey Weitzel. Significant clinical impact of recurrent *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Mexico. Cancer. 2015, Feb 1;121(3):372-8, doi: 10.1002/cncr.29058

12.- Robin Hesketh. *The Multistep Nature of Cancer. The Oncogene & Tumour Suppressor Gene Factsbook (Second Edition), 1997, Pages 54-60.*

13.- Jeffrey N. Weitzel, Veronica Lagos, Kathleen R. Blazer, et al. Prevalence of *BRCA* Mutations and Founder Effect in High-Risk Hispanic Families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1666-1671.

14.- SR Young, Robert T Pilarski, Talia Donenberg, Charles Shapiro, Lyn S Hammond, Judith Miller, Karen A Brooks, Stephanie Cohen, Beverly Tenenholz, Damini DeSai, Inuk Zandvakili, Robert Royer, Song Li and Steven A Narod. *The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer.* BMC Cancer 2009, 9:86.

15.- . Tung N, Batelli C, Allen B (2015) Frequency of Mutations in Individuals with Breast Cancer Referred for *BRCA1* and *BRCA2* Testing Using Next Generation Sequencing With a 25-Gene Panel. Cancer 121:25–33

16. Weitzel JN, Clague J, Martir-Negron A (2012) Prevalence and type of *BRCA* Mutations in Hispanics Undergoing Genetic Cancer Risk Assessment in the Southwestern United States: A report From the Clinical Cancer Genetics Community Research Network. J Clin Oncol 31:210–216

17. Vaca-Paniagua F, Alvarez-Gomez R, Fragoso-Ontiveros V (2012) Full-Exon Pyrosequencing Screening of BRCA Germline Mutations in Mexican Women with Inherited Breast and Ovarian Cancer. PLoS ONE 7:e37432
18. Ruiz-Flores P, Sinilnikova O, Badzioch M (2002) BRCA1 and BRCA2 Mutation Analysis of Early Onset and familial Breast Cancer Cases in Mexico. Hum Mutat 20:474–475. [PubMed: 12442275]
19. Calderón-Garcidueñas A, Ruiz-Flores P, Cerda-Flores R (2005) Clinical follow up of Mexican women with early onset of breast cancer and mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes. Salud Pública de México 47:110–115
20. Torres-Mejia G, Royer R, Llacuachqui M, Akbari M, Giuliano A (2014) Recurrent BRCA1 and BRCA2 Mutations in Mexican Women with Breast Cancer. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 24:498–505
21. National Center for Biothechnology Information (2017) Variation Viewer. Version 1.5.5. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variationviewer/view/?q=672%5Bgeneid%5D&assm=GCF_000001405.25. Accessed 22 May 2017
22. National Center for Biotechnology Information (2017) Variation Viewer. Version 1.5.5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?q=675%5Bgeneid%5D&assm=GCF_000001405.25. Accessed 22 May 2017
23. The NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. Version 2.2017 – December 7, 2016. <http://www.nccn.org/>. Accessed 2 February 2017
24. Rhiem K, Engel C, Engel J, Niederacher D, Sutter C (2016) BRCA1/2 mutation prevalence in triple negative breast cancer patients without family history of breast and ovarian cancer. J Clin Oncol 34:1090–1090
25. Wong-Brown MW, Meldrum CJ, Carpenter JE (2015) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in patients with triple negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat 150:71–80. doi 10.1007/s10549-015-3293-7
26. Villarreal-Garza C, Weitzel J, Llacuachqui M, Sifuentes E, Magallanes-Hoyos M (2015) The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations among young Mexican

women with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 150:389–394

27. Friebel T, Domchek S, Rebbeck T (2014) Modifiers of Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Systematic Review and Meta-Analysis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 106(6):dju091

28. Isakoff SJ, Mayer EL, He L (2015) TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy with Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 33:1902–1909. doi 1200/JCO.2014.57.6660

29. O'Shaughnessy J, Schwartzberg L, Danso MA (2014) Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 32:3840–3847. doi: 10.1200/JCO.2014.55.2984

30.- Wonshik Han, So Young Kang. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years cut-off for defining young age-onset breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2010, 119 (1): 193-200

31.- Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Shairer C, Mulvihill JJ. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst.* 1989 Dec 20; 81: 1879-86.

32.- Jeffrey N. Weitzel, Veronica Lagos, Kathleen R. Blazer, Rebecca Nelson, Charite´ Ricker, Josef Herzog, Colleen McGuire, and Susan Neuhausen. *Prevalence of BRCA Mutations and Founder Effect in High-Risk Hispanic Families.* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(7):1666–71.

33.- Timothy R. Rebbeck, PhD; Nandita Mitra, PhD; FeiWan, MS; Olga M. Sinilnikova, PhD†; Sue Healey; LesleyMcGuffog; Sylvie Mazoyer, PhD; Georgia Chenevix-Trench, PhD; Douglas F. Easton, PhD; Antonis C. Antoniou, PhD; Katherine L. Nathanson, MD; and the CIMBA Consortium. *Association of Type and Location of BRCA1 and BRCA2 Mutations With Risk of Breast and Ovarian Cancer.* *JAMA.* 2015;313(13):1347-1361. doi:10.1001/jama.2014.5985.

34.- Hereditary Cancer Syndromes and Risk AssessmentThe American College of Obstetricians and Gynecologists. VOL. 125, NO. 6, JUNE 2015.

35.- Fatima Cardoso, Sibylle Loibl, Olivia Pagani, Alessandra Graziottine, Pietro Panizza, Laura Martincich, Oreste Gentilini, Fedro Peccatori, Alain Fourquet, Suzette Delaloge, Lorenza Marott, Fré'de'rique Penault-Llorca, Anna Maria Kotti-Kitromilidou, Alan Rodger, Nadia Harbeck. *The European Society of Breast Cancer Specialists recommendations for the management of young women with breast cancer*. European Journal of Cancer (2012) 48, 3355– 3377.